

บทที่ 3

วิธีดำเนินการวิจัย

งานวิจัยทำเพื่อศึกษาผลของวัสดุเพาะ เมล็ดธัญพืชชนิดต่างๆ ต่อผลผลิต และปริมาณสารคอร์ไดเซปินในเห็ดถั่งเช่าสีทอง โดยวางแผนการทดลองแบบสุ่มสมบูรณ์ (Completely randomized design) ทำการเปรียบเทียบการเพาะเห็ดถั่งเช่าสีทอง สายพันธุ์ CMRU1 ด้วยเมล็ดธัญพืชที่แตกต่างกัน 8 ชนิด (Treatments) แต่ละชนิด ทำการทดลอง 3 ซ้ำ โดยหนึ่งหน่วยทดลองใช้อาหารเลี้ยงเชื้อเห็ด 4 กระบะ เมล็ดธัญพืชที่ใช้ในการทดลองมีดังนี้ ข้าวกล้อง ข้าวขาว ข้าวสังข์หยด ข้าวเหนียว ข้าวหอมมะลิสีฟ้า ข้าวฟ่าง ข้าวมันปู และข้าวเหลืองแกล่ จากนั้นนำไปเชื้อเห็ดไปวางในห้องบ่มเชื้อ ใช้ระยะเวลาในการเพาะ 70 วัน

วิธีการเตรียมเชื้อเห็ด

นำเชื้อเห็ดถั่งเช่าสีทอง (*Cordyceps militaris* CMRU1) ที่เก็บใน Cryotube มาผ่านน้ำเป็นเวลา 5 นาที เพื่อให้กลีเซอรอลละลาย ใช้เข็มเขี่ยเชื้อลงไฟเพื่อฆ่าเชื้อ รอให้เย็น เขี่ยเอาชิ้นเห็ดถั่งเช่าในกลีเซอรอลมาวางลงบนอาหารแข็งสำหรับเลี้ยงเชื้อพันธุ์ (SPYA) เมื่อเชื้อเห็ดเจริญเต็มจานเพาะแล้ว (14-21วัน) ให้ต่อเชื้อเห็ดจาก SPYA plate ลงในอาหารเหลว (ดูภาคผนวก) ที่หนึ่งฆ่าเชื้อแล้ว (บ่มเชื้อในที่มืด อุณหภูมิ 25 องศาเซลเซียส นาน 14 วัน) เขี่ยเอาอาหารเลี้ยงเชื้อทุกๆ 2 ชั่วโมง

สูตรอาหารแข็งสำหรับเลี้ยงเชื้อพันธุ์ (SPYA) pH = 6.5

Potato extract	1000	ml
Peptone	5	g/L
Yeast extract	5	g/L
Vitamin B1	100	mg/L
Dextrose	10	g/L
Agar	10	g/L
Sucrose	5	g/L

สูตรอาหารเหลว CMRU-L2 (Liquid medium for optimization)

(Volume 1000 ml Buffer pH 6.5–7.0)

Potato extract 1000 ml

Peptone 5 g/L

Yeast extract 5 g/L

Vitamin B1 100 mg/L

Dextrose 5 g/L

$\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ 0.002 g/L

Sucrose 5 g/L

KH_2PO_4 0.5 g/L

K_2HPO_4 0.5 g/L

$\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ 0.5 g/L

สูตรอาหารแข็ง CMRU-1

สารละลาย

น้ำต้มมันฝรั่ง (200 g) 1000 ml

กลูโคส (Glucose) 10 g/L

เปปโตน (Peptone) 10 g/L

ดีเกลือ 0.5 g/L

ปุ๋ยสูตร 0-52-34 1 g/L

ผงดักแด้ใหม่ 30 g/L

วิตามินบี 1 (Vitamin B1) 200 mg/L

วัสดุเพาะ

เมล็ดธัญพืช 80 g/กระบะ

ขั้นตอนการเตรียมอาหาร

1. ล้างมันฝรั่งและข้าวโพดฟักก่อนให้สะอาด ปอกเปลือกมันฝรั่ง หั่นตามขวางประมาณ 200 g ต้มในน้ำกลั่น 1000 ml
2. ชั่งสารทั้งหมดแล้วนำมาละลายในน้ำมันฝรั่งสกัด เติมสารละลายไฮโดรเจนเพอร์ออกไซด์ ความเข้มข้น 3 เปอร์เซ็นต์ 70 ml/L น้ำส้มสายชู 15 ml/L ปรับปริมาตร 1000 ml และค่าความเป็นกรด-ด่าง 7.0
3. ชั่งวัสดุเพาะ 80 กรัม ลงในกระบะขนาด 17 x 17 เซนติเมตร เทสารละลายลงไปให้อัตราส่วน 1 : 1 แช่ทิ้งไว้ 30 นาที
4. นำไปนึ่งฆ่าเชื้อด้วยความร้อนที่อุณหภูมิ 100 องศาเซลเซียส นาน 3 ชั่วโมง นำมาพักทิ้งไว้ 1 คืน หรือ 12 ชั่วโมง

ขั้นตอนการลงเชื้อและการบ่มเชื้อ

1. สเปรย์แอลกอฮอล์ฆ่าเชื้อในตู้เขี่ยเชื้อ และอุปกรณ์ที่เกี่ยวข้อง+เช็ดให้แห้ง เปิดหลอดยูวีเพื่อฆ่าเชื้อนาน 30 นาที
2. เขย่าขวดหัวเชื้อเหลวก่อนนำมาใช้ ทำการหยอดเชื้อเห็ดถึงเข้าสีทองลงไปประมาณ 20 ml ให้กระจายทั่วกระบะเพาะ
3. ทำการบ่ม แบ่งเป็น 3 ระยะ
 - 3.1 ระยะการเจริญของเส้นใย บ่มเชื้อในที่มืด อุณหภูมิ 22-25 องศาเซลเซียส เป็นเวลานาน 2 สัปดาห์
 - 3.2 ระยะเริ่มออกดอก เจาะรูถุงพลาสติกโดยใช้เข็มเจาะประมาณ 20 รูต่อกระบะ เพื่อระบายอากาศแก่เชื้อเห็ด ให้แสง 14 ชั่วโมงต่อวัน อุณหภูมิ 17-21 องศาเซลเซียส
 - 3.3 ระยะการเจริญเติบโตของดอก เมื่อถึงเข้าสีทองมีดอกยาวขนาด 1 cm ปรับเป็นให้แสง 12 ชั่วโมงต่อวัน อุณหภูมิ 17-21 องศาเซลเซียส
4. สเปรย์ไฮโดรเจนเพอร์ออกไซด์ 3 เปอร์เซ็นต์ ในห้องเพาะเลี้ยงทุกวัน วันละ 1 ครั้ง กรณีเส้นใยเดินเต็มแต่ไม่เกิดตุ่มดอก ให้เตรียมสารละลายตามข้อ 4 นำไปนึ่งฆ่าเชื้อ แล้วนำมาสเปรย์ลงในกระบะเพาะ (ทำในตู้เขี่ยเชื้อ)

ขั้นตอนการเก็บเกี่ยวผลผลิต

1. สเปรย์แอลกอฮอล์ฆ่าเชื้อบริเวณที่จะทำการเก็บเกี่ยวเห็ดถึงเช่าสีทอง และอุปกรณ์ที่เกี่ยวข้อง+เช็ดให้แห้ง
2. ทำการแกะถุงพลาสติกที่หุ้มกระบะเพาะออกด้วยความระมัดระวัง และใช้ช้อนแคะผลผลิตออกมาทั้งชิ้นจากกระบะ แล้ววางลงบนภาชนะที่สะอาด
3. ใช้ปากคีบที่เช็ดทำความสะอาดแล้วค่อยๆ คีบก้อนเห็ดถึงเช่าสีทองออกมาวางเรียงในถาดที่ละก้านด้วยความระมัดระวัง และควรคีบก้อนเห็ดถึงเช่าสีทองให้ถึงโคนต้นหรือให้อยู่ในสภาพสมบูรณ์
4. ทำการแยกวัสดุเพาะที่เหลือจากการเก็บเกี่ยวก้อนเห็ดถึงเช่าสีทองออกวางลงในถาดที่ทำ ความสะอาดเรียบร้อยแล้ว
5. ทำการอบเห็ดและวัสดุเพาะเห็ดถึงเช่าสีทอง ที่อุณหภูมิ 50 องศาเซลเซียส โดยก้อนเห็ดถึงเช่าสีทองใช้เวลาในการอบ 12 ชั่วโมง และวัสดุเพาะเห็ดถึงเช่าสีทองใช้ระยะเวลาในการอบ นาน 15 ชั่วโมง เพื่อให้มีความชื้นไม่เกิน 10-13 เปอร์เซ็นต์
6. หลังจากนำออกจากตู้อบแล้วให้เก็บผลผลิตไว้ในภาชนะที่สามารถป้องกันความชื้นได้หรือเก็บไว้ในบรรจุภัณฑ์ภายใต้สภาพสุญญากาศ
7. เก็บผลผลิตไว้ที่อุณหภูมิ 4-8 องศาเซลเซียส เพื่อนำไปใช้ประโยชน์หรือเพื่อการวิเคราะห์ อื่นๆ ต่อไป

การวัดปริมาณสารคอร์โคเซปิน

การวัดปริมาณสารคอร์โคเซปินทำได้โดยวิธีทดสอบของ Hudng *et al.* (2009) ดอกเห็ดถึงเช่าสีทองอบแห้งถูกนำมาบดให้ละเอียด (ขนาด 50 เมช) นำไปใส่ในไนโตรเจนเหลว จากนั้นนำผงเห็ดถึงเช่าสีทอง 1 กรัม ไปผสมกับ 10 มิลลิลิตร เมทานอล/น้ำ (50/50, V/V) ในหลอดสำหรับปั่นเหวี่ยงขนาด 50 มิลลิลิตร จากนั้นนำไปสกัดสารคอร์โคเซปิน โดยใช้เครื่องอัลตราโซนิกที่กำลัง 75 วัตต์ หลังจากปั่นเหวี่ยงแล้ว ให้ทำซ้ำอีก 2 ครั้ง ของเหลวที่อยู่ด้านบนที่ได้จากการปั่นเหวี่ยง 3 ครั้งถูกผสมเข้าด้วยกันแล้ววัดปริมาตร จากนั้นทำการกรองผ่านเยื่อกรองขนาด 0.45 ไมโครเมตร ก่อนทำการวิเคราะห์สารคอร์โคเซปินด้วยเครื่อง High Performance Liquid Chromatography (HPLC)

การบันทึกข้อมูล

1. น้ำหนักเห็ดสดเฉลี่ยต่อกระบะ (กรัม)
2. น้ำหนักเห็ดแห้งเฉลี่ยต่อกระบะ (กรัม)
3. ปริมาณสารคอรีโดเซปิน (มิลลิกรัมต่อกิโลกรัม)

สถานที่ทำการทดลอง

คณะเทคโนโลยีการเกษตร มหาวิทยาลัยราชภัฏเชียงใหม่ ตำบลสะลวง อำเภอแม่ริม จังหวัดเชียงใหม่

ระยะเวลาในการทดลอง

ธันวาคม 2554 ถึง พฤษภาคม 2556

การวิเคราะห์ข้อมูล

วิเคราะห์ความแปรปรวนของข้อมูลโดยใช้โปรแกรมสถิติสำเร็จรูป และเปรียบเทียบแตกต่างของค่าเฉลี่ยโดยวิธี Duncan's new multiple rang test